

QUELQUES ASPECTS ANCIENS ET MODERNES DE LA PHOTOSYNTHÈSE

par **J. M. BOVÉ**

*Institut Français de Recherches Fruitières Outre-Mer (I. F. A. C.)
(Service de Biochimie)*

TROISIÈME PARTIE *

QUELQUES ASPECTS ACTUELS DE LA PHOTOSYNTHÈSE :

L'UTILISATION DE L'ATP ET DU TPNH_2

Au cours de la deuxième partie de cet article nous avons vu comment les chloroplastes des plantes vertes et les chromatophores des bactéries photosynthétiques transforment l'énergie lumineuse en l'énergie chimique de l'ATP et du TPNH_2 .

Nous allons examiner maintenant comment l'ATP et le TPNH_2 photosynthétiques sont utilisés pour l'assimilation du gaz carbonique en sucres ainsi que pour d'autres biosynthèses cellulaires.

V (1). L'ASSIMILATION PHOTOSYNTHÉTIQUE DU CO_2 CHEZ LES PLANTES VERTES

1. L'assimilation du CO_2 dans la cellule photosynthétique intacte ; le cycle de Calvin.

C'est à Calvin et à ses collaborateurs que revient le mérite d'avoir mis en évidence, au cours des douze dernières années, la suite des réactions qui, à partir du gaz carbonique, mènent à la formation des sucres chez les plantes vertes (Bassham et Calvin, 1957). L'ensemble de ces réactions est maintenant connu sous le nom de « cycle de Calvin » (fig. 24) (1). Pour ce

travail, Calvin vient de recevoir le prix Nobel de chimie 1961.

a) Matériel végétal et Techniques.

Le matériel végétal principalement utilisé par Calvin est l'algue verte unicellulaire, *Chlorella*.

La technique mise en œuvre par l'équipe de Calvin pour étudier l'assimilation photosynthétique de CO_2 consiste à éclairer une suspension de Chlorelles en présence de gaz carbonique marqué au carbone 14, isotope radioactif du carbone 12. A la fin de l'éclairement, les Chlorelles sont « fixées » dans l'alcool chaud à 80 %. L'extrait alcoolique obtenu contient les composés solubles formés à partir du CO_2 assimilé par les algues pendant la période d'illumination. Ces composés sont séparés par chromatographie à deux dimensions ; leur position sur le chromatogramme est repérée en plaçant celui-ci sur un film à rayons X ; les taches noires qui apparaissent sur le film après révélé-

(*) Première partie : La Photosynthèse de Priestley à Van Niel, Bové (J. M.), *Fruits*, 16 (1961), 89-101.

Deuxième partie : Quelques aspects actuels de la Photosynthèse : La Formation de l'ATP et du TPNH_2 , Bové (J. M.), *Fruits*, 16 (1961), 479-511.

(1) Suite de la numérotation de la deuxième partie.

lation photographique correspondent à l'emplacement des produits radioactifs sur le chromatogramme (autoradiographie).

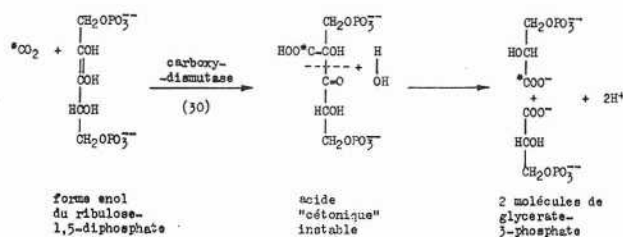
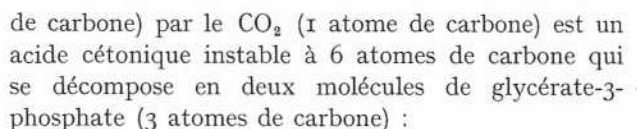
Une fois les taches radioactives repérées sur la feuille de chromatographie, il convient d'identifier le ou les composés radioactifs qui se trouvent à cet emplacement. C'est là le travail le plus difficile.

b) *Les trois phases du cycle de Calvin* (fig. 24).

α) Phase de carboxylation.

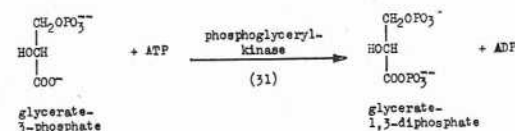
En éclairant les *Chlorelles* en présence de $^{14}\text{CO}_2$, pendant un temps très court, de l'ordre de quelques secondes, Calvin et ses collaborateurs réussirent à mettre en évidence le premier produit stable de la fixation photosynthétique du gaz carbonique : c'est le glycérate-3-phosphate, composé organique à trois atomes de carbone.

Ensuite, ils réussirent à identifier le corps sur lequel se fixe la molécule de CO_2 : c'est un sucrédiphosphate à 5 atomes de carbone, le ribulose-1,5-diphosphate. Cette réaction par laquelle une molécule de CO_2 est fixée sur une molécule de ribulose-1,5-diphosphate, avec formation d'un groupement carboxyl, est une réaction de carboxylation ; l'enzyme qui la catalyse est l'enzyme de carboxylation, encore appelée carboxydismutase. Le produit de la réaction de carboxylation du ribulose-1,5-diphosphate (5 atomes



β) Phase de réduction.

Le glycérate-3-phosphate formé pendant la phase de carboxylation est transformé en triose phosphate en deux étapes, au cours desquelles vont intervenir l'ATP et le TPNH₂. Dans un premier stade, le glycérate-3-phosphate est phosphorylé en glycérate-1,3-diphosphate par l'ATP en présence de la phosphoglycérylkinase :



Au cours du deuxième stade, le glycérate-1,3-diphosphate est réduit par le TPNH₂ en un triose-

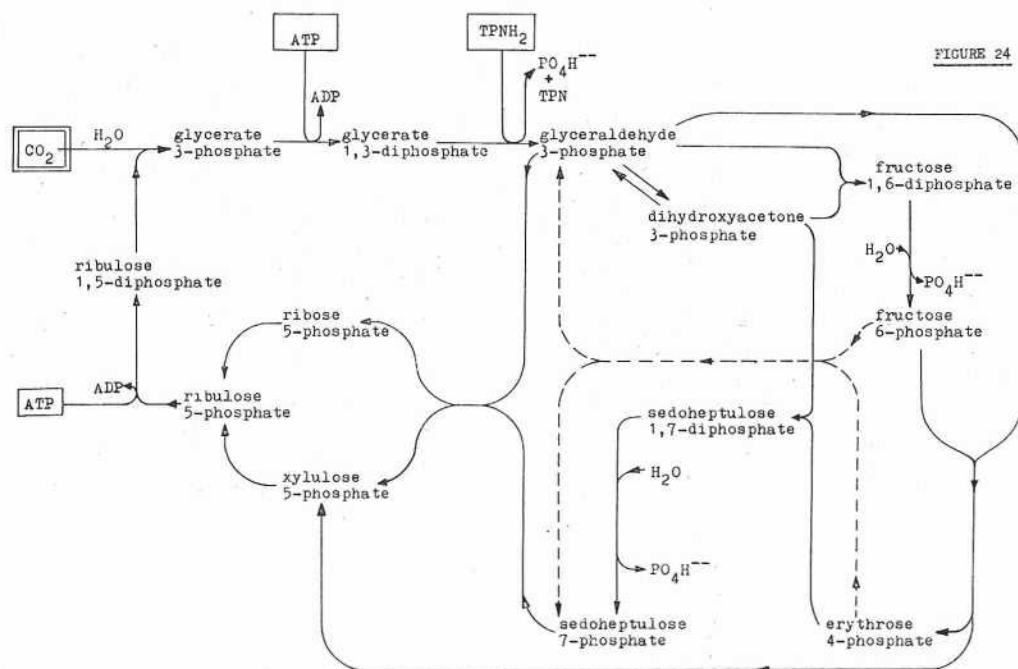
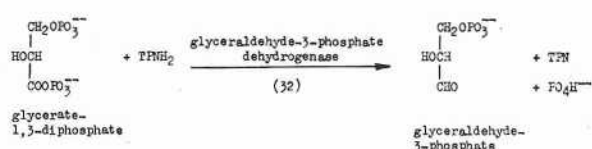
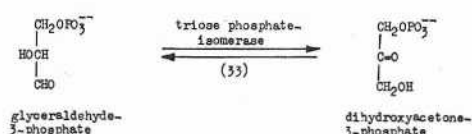


FIG. 24. — Schéma de l'assimilation du CO_2 suivant CALVIN : « Cycle de Calvin ».

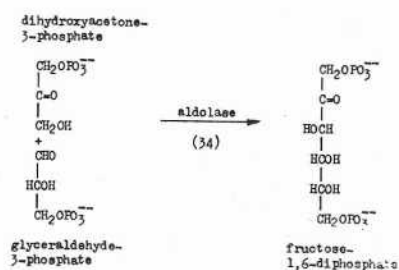
phosphate, le glycéraldéhyde-3-phosphate : la réduction est catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase :



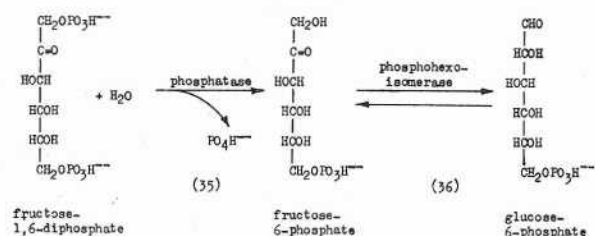
Il existe, dans les cellules vertes, une enzyme qui isomérise le glycéraldéhyde-3-phosphate en dihydroxyacétone-3-phosphate et inversement ; c'est la triose-phosphate isomérase :



Une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate et une molécule de dihydroxyacétone-3-phosphate se condensent ensuite pour former une molécule de fructose-1,6-diphosphate ; c'est l'aldolase qui catalyse cette réaction :



Le fructose-1,6-diphosphate, en subissant l'action d'une phosphatase, perd l'un de ses deux groupements phosphate et est transformé en fructose-6-phosphate (35), que la phosphohexo-isomérase peut isomériser en glucose-6-phosphate (36) :



La synthèse de nombreux sucres a lieu à partir de ces hexoses phosphates. Nous n'envisagerons pas ces

synthèses dans le cadre de cet article ; pour la biosynthèse de l'amidon, entre autres, on pourra consulter l'article récent de Leloir et de ses collaborateurs (LELOIR, 1960).

Il convient de remarquer ici que les réactions qui mènent à la formation du fructose-1,6-diphosphate, à partir du glycérate-3-phosphate, sont les réactions inverses de celles qui, dans la glycolyse, dégradent le fructose-1,6-diphosphate en glycérate-3-phosphate : (voir Bové, 1961 b, p. 359) ; toutes ces réactions sont réversibles.

γ) Phase de régénération du ribulose-1,5 diphosphate.

Il nous reste maintenant à expliquer l'origine du ribulose-1,5-diphosphate sur lequel se fixe la molécule de CO₂ pendant la phase de carboxylation (réaction 30). Le ribulose-1,5-diphosphate est absolument nécessaire à la fixation du CO₂ ; en son absence la fixation photosynthétique du CO₂ ne peut avoir lieu.

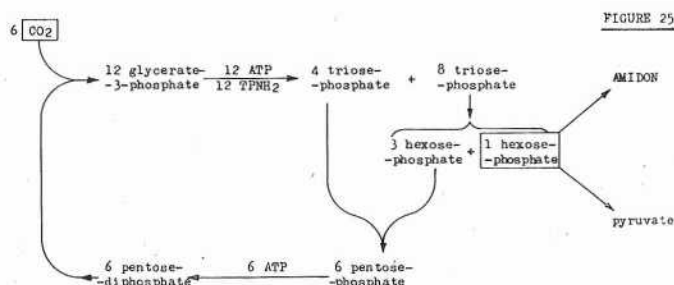
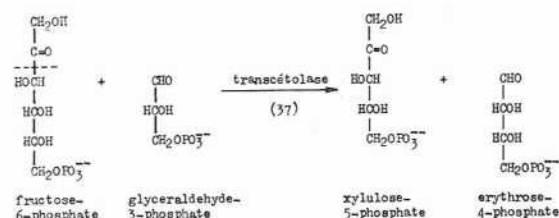
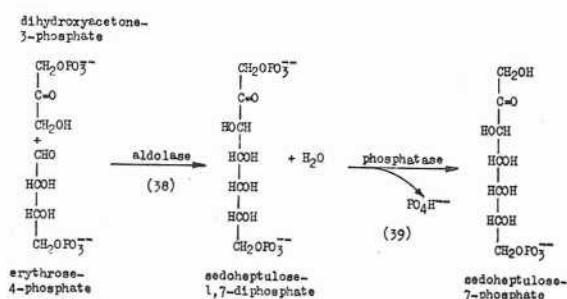


FIG. 25. — L'assimilation du CO₂ suivant le Cycle de Calvin ; synthèse nette de sucres et régénération de l'« accepteur » du CO₂ (ribulose-1,5-diphosphate).

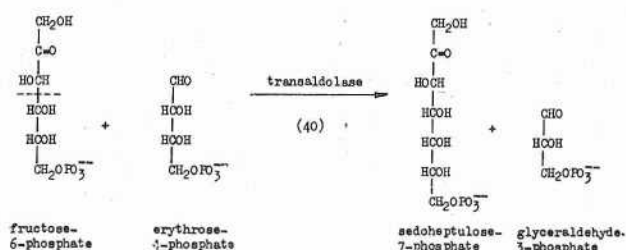
Au début d'une période de photosynthèse, le ribulose-1,5-diphosphate ne peut être formé qu'à partir des réserves de sucres préexistants dans la cellule. Au cours d'une période de photosynthèse, il est régénéré à partir des produits mêmes de l'assimilation du CO₂ (fig. 25). Dans les deux cas, la suite des réactions qui aboutissent au ribulose-1,5-diphosphate débute par la combinaison d'une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate et d'une molécule de fructose-6-phosphate pour donner une molécule de xylulose-5-phosphate et une molécule d'érythrose-4-phosphate (fig. 24). Cette réaction est catalysée par une enzyme essentielle, la transcétolase. Cette enzyme est spécialisée dans le transfert d'un groupement céto ($-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$) à un aldéhyde ; elle nécessite la présence de la thiamine-pyrophosphate comme coenzyme :



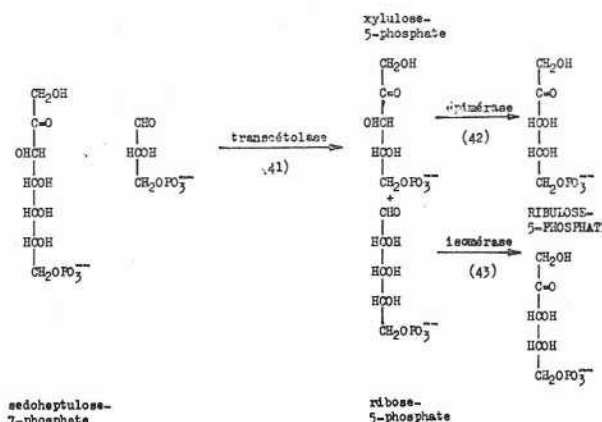
L'érythrose-4-phosphate ainsi formé se combine avec le dihydroxyacétone-3-phosphate pour donner le sédoheptulose-1,7-diphosphate ; la réaction est catalysée par l'aldolase (38). Le sédoheptulose-1,7-diphosphate perd ensuite un groupement phosphate sous l'action de la phosphatase pour donner le sédoheptulose-7-phosphate (39) :



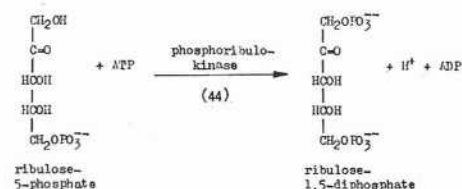
Le sédoheptulose-7-phosphate peut aussi se former par la combinaison de l'érythrose-4-phosphate et du fructose-6-phosphate (fig. 24, lignes pointillées), on obtient en même temps le glycéraldéhyde-3-phosphate ; la réaction est catalysée par la transaldolase, qui a la propriété de transférer le groupe $\text{CH}_2\text{OH} - \text{CO} - \text{CHOH} -$ à un aldéhyde :



Les réactions se continuent par le transfert du groupement céto ($-\text{CO} - \text{CH}_2\text{OH}$) du sédoheptulose-7-phosphate à la glycéraldéhyde-3-phosphate sous l'action, à nouveau, de la transcétole (41) ; on obtient deux pentoses phosphates, le xylulose-5-phosphate, déjà rencontré précédemment (37), et le ribose-5-phosphate, qui seront tous les deux isomérisés en ribulose-5-phosphate (42) et (43) :



Enfin, nous arrivons à la formation du ribulose-1,5-diphosphate : le ribulose-5-phosphate est phosphorylé en ribulose-1,5-diphosphate par la phosphoribulokinase avec participation d'ATP :



Le ribulose-1,5-diphosphate étant ainsi régénéré, une nouvelle molécule de CO_2 peut être assimilée.

c) Caractéristiques du cycle de Calvin.

Le mécanisme de l'assimilation du CO_2 suivant le schéma de Calvin (fig. 24) est caractérisé par les faits suivants :

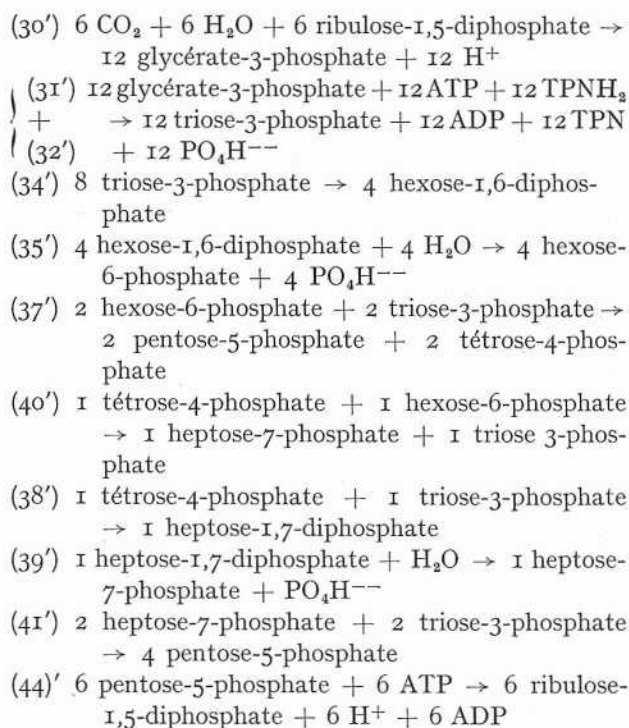
— l'accepteur du CO_2 est le ribulose-1,5-diphosphate ;

— le produit de la carboxylation du ribulose-1,5-diphosphate par le CO_2 se décompose spontanément en deux molécules de glycérate-3-phosphate ;

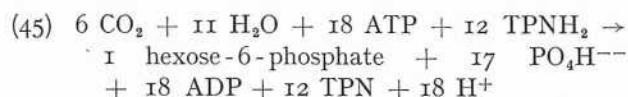
— entre la fixation du CO_2 sur le ribulose-1,5-diphosphate et l'obtention du glycérate-3-phosphate il n'y a pas réduction. La seule étape réductrice se place entre le glycérate-3-phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate ; elle a lieu en deux stades : l'ATP phosphoryle d'abord le glycérate-3-phosphate en glycérate-1,3-diphosphate ; ensuite le TPNH_2 réduit celui-ci en triose-3-phosphate ;

— la régénération du ribulose-1,5-diphosphate implique toute une série de réactions dont la dernière consiste en la phosphorylation par l'ATP du ribulose-5-phosphate en ribulose-1,5-diphosphate : c'est la deuxième et dernière réaction à laquelle participe l'ATP dans le schéma de Calvin ;

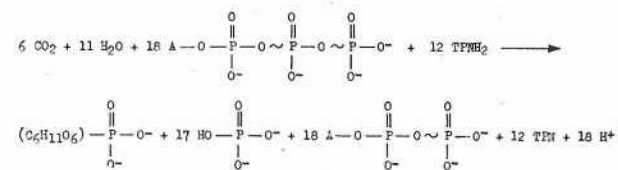
— le bilan des réactions de l'assimilation du CO_2 , suivant le schéma de la figure 24, est le suivant :



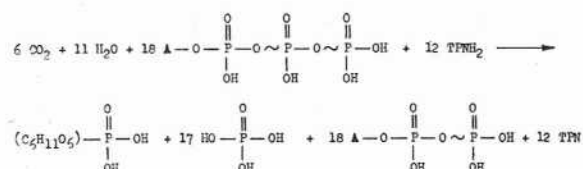
La somme des réactions précédentes est la réaction (45).



Pour mieux comprendre la stœchiométrie de l'équation globale (45) on peut l'expliciter de la façon suivante :



ou, si l'on écrit les corps sous leur forme acide, non dissociée (acide « phosphorique » au lieu de « phosphate » ; acide « glycérique » au lieu de « glycérate ») :



Le fait essentiel révélé par l'équation globale (45) est le suivant : 18 molécules d'ATP et 12 molécules de TPNH_2 sont nécessaires pour former une molécule d'hexose-phosphate à partir de 6 molécules de CO_2 .

Comme le montre la figure 25, parmi les 12 molécules de triose-phosphate formées suivant (31)' + (32)', 8 sont utilisées pour synthétiser 4 molécules d'hexose-phosphate. Trois de ces molécules d'hexose-phosphate, ainsi que les 4 molécules restantes de triose-phosphate, servent à régénérer le ribulose-1,5-diphosphate. Seule, la quatrième molécule d'hexose-phosphate correspond à une nette synthèse : elle pourra servir à former d'autres sucres ou bien elle pourra s'engager dans les voies du catabolisme (glycolyse, puis fermentation ou cycle de Krebs).

d) *Cycle des pentoses (Horecker) et cycle de Calvin.*

Dans le schéma de la figure 24 les réactions sont représentées comme se déroulant dans un sens unique : celui qui, grâce à la fixation de CO_2 par la carboxydismutase, mène d'abord à la synthèse de trioses-phosphates et d'hexoses-phosphates ; ensuite à la régénération du ribulose-1,5-diphosphate.

Mais toutes ces réactions sont réversibles, sauf celles catalysées par le carboxydismutase (39) et la phosphatase (35 et 39) ; elles peuvent se dérouler dans le sens inverse de celui de la figure 24 lorsqu'elles participent à d'autres fonctions que l'assimilation photosynthétique du CO_2 . Nous avons déjà mentionné plus haut que la phase réductrice de l'assimilation du CO_2 (glycérate-3-phosphate \rightarrow glyceraldéhyde-3-phosphate) équivaut aux réactions inverses de la déshydrogénation du glyceraldéhyde-3-phosphate en glycérate-3-phosphate dans la glycolyse. De même, les réactions impliquées dans la régénération du ribulose 1,5-diphosphate peuvent se dérouler dans le sens inverse : au lieu d'aboutir à des pentoses-phosphates à partir de trioses-phosphates, on obtient des trioses-phosphates à partir des pentoses-phosphates. Cette transformation des pentoses-phosphates en trioses-phosphates, et partant en hexoses-phosphates ainsi que les réactions inverses, constituent ce que l'on appelle le cycle des pentoses, ou encore cycle de Horecker (Horecker, 1958). Il s'agit essentiellement d'un réarrangement de trioses-phosphates, de pentoses-phosphates, d'hexoses-phosphates et d'un tétrorse-phosphate entre eux. La mise en évidence du cycle des pentoses en général et l'étude des enzymes qui y participent en particulier (transcétolase, transaldolase, isomérase, épimérase...) sont en très grande partie l'œuvre de Horecker.

Le cycle des pentoses a des fonctions multiples. D'abord il participe à l'oxydation des hexoses-phosphates par une voie différente de celle de la glycolyse.

la fixation du CO_2 par les chloroplastes entiers. L'addition de TPN et d'ATP était sans effet.

β) Chloroplastes brisés (1) (Whatley, 1956).

Il semblait, au début, que la fixation du CO_2 ne pouvait se dérouler qu'avec des chloroplastes entiers. En effet, la fixation de CO_2 était complètement abolie avec des chloroplastes brisés, obtenus en traitant les chloroplastes entiers par l'eau (éclatement des chloroplastes en solution hypotonique). Pendant ce traitement, les protéines solubles des chloroplastes passaient dans l'eau. On pouvait les séparer des grana par centrifugation : le culot renfermait les grana, le surnageant contenait les protéines solubles ; ce surnageant constitue ce qu'on appelle depuis « extrait aqueux de chloroplastes » (E. A. C.).

Cet E. A. C. s'est révélé très important dans la fixation du CO_2 . En effet, Arnon et ses collaborateurs montrèrent que l'addition de l'E. A. C. à des chloroplastes brisés, incapables donc de fixer du CO_2 , restaurait l'assimilation du CO_2 . Cette stimulation considérable est due à la présence dans l'E. A. C. des enzymes nécessaires à la fixation du CO_2 : carboxydismutase, glyceraldéhyde-phosphate déshydrogénase, phosphoglycéril kinase, phosphopentokinase, phosphorylase... (Whatley, 1956 ; Losada, 1960 a).

Les produits de fixation obtenus avec les chloroplastes brisés additionnés d'E. A. C. étaient les mêmes que ceux formés par les chloroplastes entiers, mais le rapport entre les produits solubles et les produits insolubles était modifié : les chloroplastes brisés synthétisaient beaucoup moins d'amidon (2).

La fixation du CO_2 par les chloroplastes brisés en présence de l'E. A. C. était grandement stimulée par l'addition d'ATP de TPN et d'un phosphate organique (sucre-phosphate ou glycérate-phosphate), alors que ces substances avaient été sans effet sur les chloroplastes entiers. Cela tendait à montrer que dans les

chloroplastes entiers la concentration de ces substances n'était pas limitante ; au contraire, dans une préparation de chloroplastes brisés par éclatement dans l'eau, ces substances se trouvaient diluées et leur concentration devenait limitante. Un tel effet de dilution est souvent observé lorsqu'on brise les structures cellulaires, et est mis à profit pour étudier les besoins en cofacteurs.

L'augmentation de la quantité de CO_2 fixé, obtenue par l'addition d'un sucre-phosphate ou de glycérate-phosphate, était assez facile à expliquer : ces composés devaient jouer dans les chloroplastes brisés le même rôle que les sucres de réserve dans la cellule intacte ou dans les chloroplastes entiers ; au début d'une période de photosynthèse ils étaient sans doute utilisés pour former, par le cycle des pentoses, du ribulose-1,5-diphosphate, l'accepteur indispensable de la molécule de CO_2 . On appelle ces phosphates organiques des « précurseurs » du ribulose-1,5-diphosphate.

La stimulation exercée par l'ATP sur l'assimilation du CO_2 par des chloroplastes brisés en présence de l'E. A. C. amenait immédiatement à l'esprit les questions suivantes : « Quelle est l'origine de l'ATP nécessaire pour la fixation du CO_2 ? Est-ce l'ATP provenant de la phosphorylation photosynthétique ? » Pour Arnon et ses collaborateurs, oui, c'était l'ATP formé par les chloroplastes. En conséquence, ils proposèrent le schéma de la figure 27 ; c'était encore à l'époque où la théorie de la photolyse de l'eau était largement acceptée. Mais il restait à démontrer directement que l'ATP

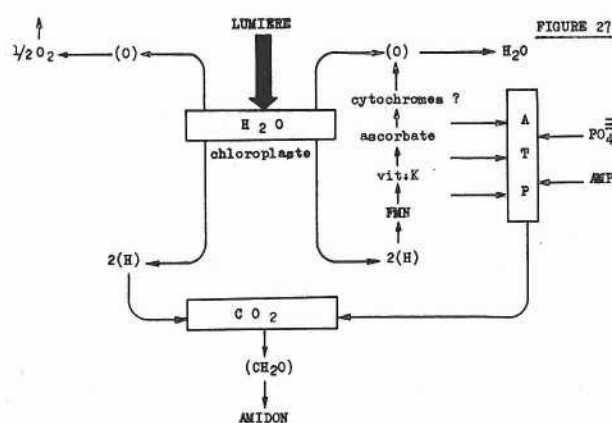


FIG. 27. — Schéma de la photosynthèse dans les chloroplastes isolés (Arnon, 1956).

photosynthétique était bien celui utilisé pour l'assimilation du CO_2 .

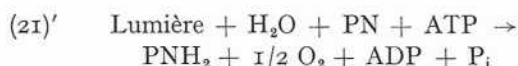
De même, pour expliquer la stimulation exercée par

(1) Rappelons que dans un chloroplaste de plante supérieure on distingue un *stroma*, dans lequel sont répartis des corpuscules appelés *grana* : le granum a une structure lamellaire, ce qui le fait comparer parfois à un ensemble de disques placés les uns sur les autres ; les couches entre les disques sont appelées *lamelles de grana*. Les lamelles de grana sont réunies à celles des grana voisins par des *lamelles de stroma*. Les pigments photosynthétiques sont localisés dans les grana et peuvent être séparés du stroma par centrifugation de chloroplastes brisés ; le culot, vert foncé, est constitué par les grana insolubles dans l'eau ; le stroma se trouve dans le surnageant, dépourvu de chlorophylle.

(2) Cela ne signifie cependant pas que l'intégrité de la structure du chloroplaste soit indispensable à la synthèse d'amidon. Les récents résultats de Leloir, et de ses collaborateurs indiquent que la biosynthèse de l'amidon n'est pas liée à la structure du chloroplaste (Leloir, 1960).

le TPN sur la fixation du CO_2 , on en était réduit à des hypothèses. Whatley n'hésitait pas à faire intervenir le pyridine nucléotide (PN) dans la réduction du CO_2 , en accord avec l'hypothèse de Ruben et le schéma de Calvin (Whatley, 1956).

Il admettait que la réduction du PN était couplée à la photolyse de l'eau et que cette réduction pouvait nécessiter une participation d'ATP suivant la réaction :



Il n'hésitait pas à inclure le PN dans le schéma de la photosynthèse comme l'illustre la figure 28.

C'est alors qu'advint, en 1958, dans le laboratoire d'Arnon, la découverte capitale de la phosphorylation photosynthétique non cyclique (réaction 21) : elle

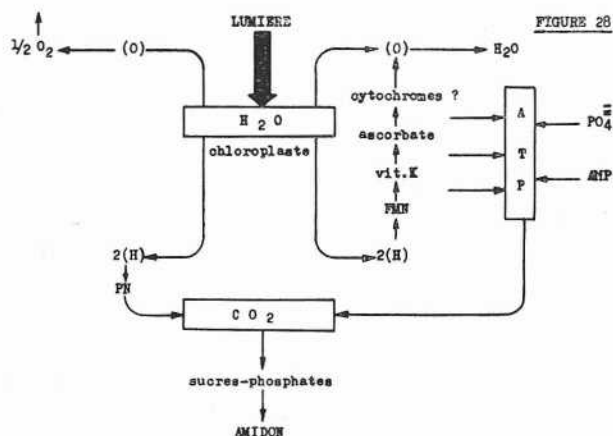
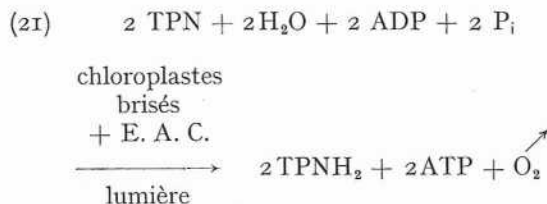


FIG. 28. — Schéma de la photosynthèse dans les chloroplastes isolés (Whatley, 1956).

mettait en évidence que les chloroplastes éclairés, non seulement étaient capables de réduire TPN en TPNH_2 qui s'accumulait, mais qu'en outre une formation d'ATP était couplée à cette réaction (Arnon, 1959 a) :



Whatley avait admis qu'un apport d'ATP pût être nécessaire à la réduction photosynthétique du PN (réaction 21') ; voilà que les chloroplastes dépassaient toutes les espérances et qu'en plus du TPNH_2 , ils

formaient de l'ATP ! (réaction 21). On ne pouvait qu'être frappé par cette capacité des chloroplastes à produire les deux composés, ATP et TPNH_2 , nécessaires à l'assimilation du CO_2 suivant les théories les plus généralement admises à l'époque. Rapidement, dès lors, les éléments du puzzle allaient se mettre en place.

b) *Couplage de l'assimilation du CO_2 à la formation photosynthétique d'ATP et de TPNH_2* (Trebst, 1958).

Sachant par les expériences précédentes, que les chloroplastes brisés, en présence de l'E. A. C. étaient capables de former, à la lumière, de l'ATP et du TPNH_2 suivant la réaction (21) et sachant que l'E. A. C. contenait les enzymes nécessaires à la fixation du CO_2 , l'équipe d'Arnon allait essayer de coupler la fixation de CO_2 à cette formation d'ATP et de TPNH_2 : il « suffisait » pour cela de faire se dérouler la réaction (21) à la lumière en présence de $^{14}\text{CO}_2$. C'est ce que firent Trebst, Tsujimoto et Arnon (Trebst, 1958).

L'expérience fut concluante ; une assimilation de CO_2 avait eu lieu avec formation de sucres phosphates : dihydroxyacétone-phosphate, fructose-monophosphate, glucose-monophosphate, fructose-diphosphate, ribulose-diphosphate ; il y avait aussi formation de glycérate-monophosphate (fig. 29).

À l'obscurité, où ni ATP ni TPNH_2 ne pouvaient être formés, très peu de CO_2 était fixé.

Cette expérience mettait donc clairement en évidence l'utilisation de l'ATP et du TPNH_2 , formés à la lumière, pour l'assimilation simultanée du CO_2 .

c) *Séparation des réactions « claires » (photochimiques) des réactions « sombres » (non photochimiques)* (Trebst, 1958).

Dans la mesure où la lumière était indispensable à la formation d'ATP et de TPNH_2 , on pouvait dire que la lumière était indispensable à l'assimilation du CO_2 . Était-ce là le seul rôle de la lumière dans l'assimilation du CO_2 ? Pour répondre à cette question, Arnon et ses collaborateurs allaient reprendre l'expérience précédente, mais en y apportant une modification essentielle : au lieu de laisser se dérouler l'assimilation du CO_2 dans le même temps où l'ATP et le TPNH_2 étaient formés à la lumière suivant la réaction (21), ils effectuèrent d'abord la réaction (21) en l'absence de $^{14}\text{CO}_2$, puis, une fois l'ATP et le TPNH_2 formés, ils injectèrent le $^{14}\text{CO}_2$ à l'obscurité et laissèrent incuber le mélange réactionnel pendant 30 minutes, toujours à l'obscurité. Le résultat de cette expérience ?

Le $^{14}\text{CO}_2$ était tout aussi bien assimilé à l'obscurité, en présence d'ATP et de TPNH_2 , qu'il l'avait été à la lumière dans l'expérience d'avant. L'équipe d'Arnon réussissait ainsi à séparer dans le temps, d'une part la formation à la lumière d'ATP et de TPNH_2 , d'autre part l'assimilation du CO_2 à l'obscurité. Ainsi, il était démontré que l'assimilation du CO_2 , pourvu que ATP et TPNH_2 fussent présents, s'effectuait bien par une suite de réactions « obscures »

Dans une réaction obscure, la chlorophylle ne devrait pas intervenir ; en conséquence, les grana, siège de la chlorophylle, ne devraient pas être indispensables à l'assimilation du CO_2 . D'où l'idée d'un troisième type d'expériences où l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ allait être effectuée en l'absence de grana. Pour cela, comme dans l'expérience précédente, il fallait d'abord produire de l'ATP et du TPNH_2 à la lumière, en l'absence de CO_2 .

Cette réaction nécessite, comme nous le savons, et les grana (captation de l'énergie lumineuse et enzyme de la phosphorylation) et l'extrait aqueux de chloroplastes (TPN-réductase photosynthétique, nécessaire à la formation de TPNH_2). Une fois l'ATP et le TPNH_2 ainsi formés, il fallait ensuite éliminer les grana ; c'est chose aisée par centrifugation : les grana vont dans le

culot, et dans le surnageant se retrouvent l'extrait aqueux de chloroplastes (enzymes de l'assimilation du CO_2), l'ATP et le TPNH_2 . Enfin, il fallait injecter le $^{14}\text{CO}_2$ dans ce surnageant et laisser le tout incuber, pendant 30 minutes et à l'obscurité. Cette expérience fut elle aussi couronnée de succès, comme le montre la figure (30) ; le CO_2 était bien assimilé à l'obscurité par le seul extrait aqueux de chloroplastes en présence d'ATP et de TPNH_2 . Cela revenait à séparer non seulement dans le temps, mais aussi dans l'espace, d'une part les réactions « claires », formation d'ATP et de TPNH_2 , d'autre part les réactions « sombres », assimilation du CO_2 .

La figure 31 schématise la photosynthèse telle que l'envisageait l'équipe d'Arnon à la suite de ces résultats.

d) *Rôles respectifs de la phosphorylation non cyclique et de la phosphorylation cyclique dans l'assimilation du CO_2* (Trebst, 1959).

Dans toutes les expériences qui précèdent, la formation des quantités-substrat d'ATP et de TPNH_2 nécessaires à l'assimilation du CO_2 était obtenue par phosphorylation photosynthétique *non cyclique* (réaction 21). A quoi pouvait bien servir alors la phosphorylation *cyclique*, mécanisme hautement efficace pour la production d'ATP ? Jouait-elle un rôle dans l'assimilation du CO_2 ou au contraire était-ce un « court-circuit » du trajet normal des électrons, comme l'envisageait Bassham : « Il est tout à fait possible que, dans une cellule intacte, nous ne connaissions pas encore le trajet entre la réaction photochimique et le réducteur qui est utilisé dans le cycle de réduction du carbone. Mais dans vos préparations de chloroplastes, il se peut que vous court-circuitiez ce trajet par l'addition de vitamine K ou de FMN, qui acceptent directement les électrons de la réaction de Hill et les utilisent alors pour la phosphorylation photosynthétique » (Bassham, 1957 dans : *Research in photosynthesis*).

Par ailleurs, dans les expériences précédentes, où le CO_2 était assimilé à l'obscurité, en présence d'ATP et de TPNH_2 formés préalablement à la lumière, cet ATP et ce TPNH_2 formés intervenaient en quantités-substrat, et non pas en quantités catalytiques. Au fur et à mesure que le phosphate terminal de l'ATP et les hydrogènes réducteurs du TPNH_2 étaient utilisés pour l'assimilation du CO_2 à l'obscurité, l'ADP et le TPN s'accumulaient ; ils ne pouvaient pas redonner ni de l'ATP ni du TPNH_2 suivant la réaction 21, car pour cela la lumière eût été nécessaire. Dans ce type d'expérience, seules des quantités-substrat d'ATP et de

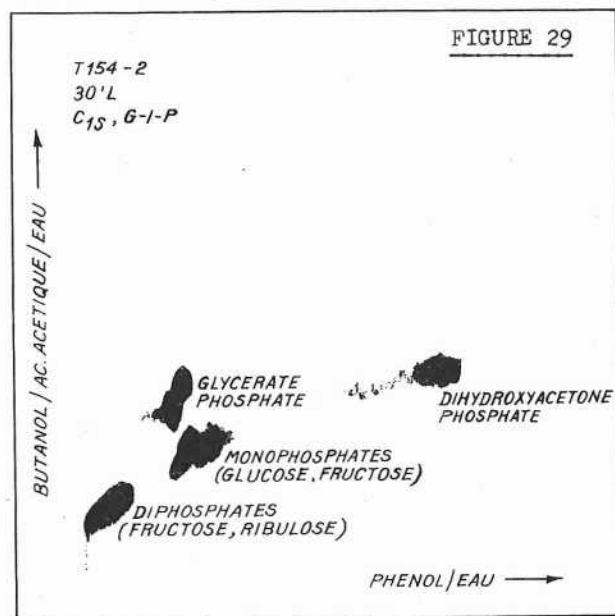


Fig. 29. — Radioautographie d'un chromatogramme montrant les produits solubles de l'assimilation de $^{14}\text{CO}_2$ à la lumière par des chloroplastes brisés en présence de l'extrait aqueux de chloroplastes (E. A. C.) et de quantités substrat d'ADP et de TPN (2 micromoles/2,5 ml). « Précurseur » : glucose-1-phosphate (0,3 micromoles/2,5 ml). (Trebst, 1958).

TPNH₂ rendaient possibles une assimilation continue du CO₂.

Or, dans la cellule entière, l'ATP et le TPNH₂ interviennent en quantités catalytiques et non pas en quantités-substrat : au fur et à mesure qu'ils sont utilisés ils sont régénérés à partir de l'ADP et du TPN.

Est-il possible de constituer, au moyen de chloroplastes isolés un tel système catalytique dans lequel l'ATP et le TPNH₂ présents en faible quantité seulement, seraient régénérés au fur et à mesure de leur utilisation pour la fixation du CO₂ ? Trebst, Losada et Arnon ont réalisé un tel système : ils ont simplement effectué la réaction (21) avec des concentrations catalytiques d'ADP (0,5 μM au lieu de 2) et de TPN (0,3 μM au lieu de 2) et ils ont ajouté le ¹⁴CO₂ dès le début de l'éclairement. Dans ce système, l'assimilation du CO₂ doit, bien entendu, se faire obligatoirement à la lumière afin que l'ATP et le TPNH₂, présents en quantités catalytiques seulement, puissent être continuellement régénérés.

Cette expérience est donc presque identique à celle décrite un peu plus haut (b), la seule différence réside dans les concentrations d'ADP et de TPN : ici il s'agit de concentrations catalytiques (système catalytique), là, il s'agissait de concentrations-substrat (système non catalytique).

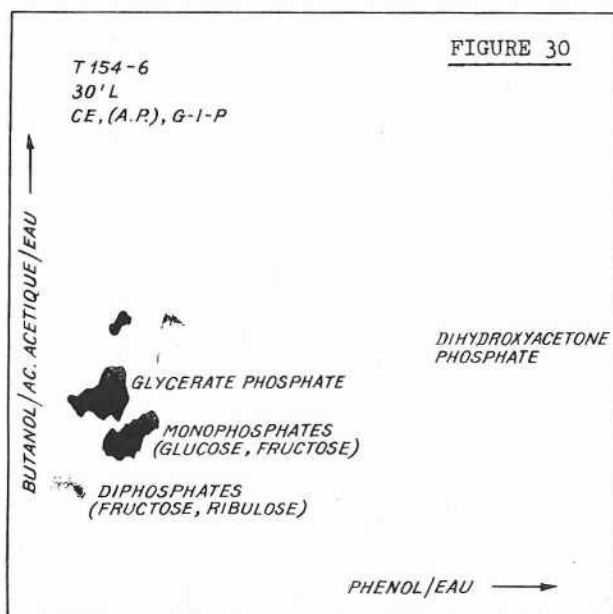


FIG. 30. — Radioautographie d'un chromatogramme montrant les produits solubles de l'assimilation du ¹⁴CO₂ à l'obscurité par l'extrait aqueux de chloroplastes (E. A. C.) en présence de quantités-substrat d'ATP et de TPNH₂ (2 micromoles/2,5 ml) formés préalablement à la lumière. « Précurseur » : glucose-1-phosphate (0,3 micromoles/1,5 ml) (Trebst, 1958).

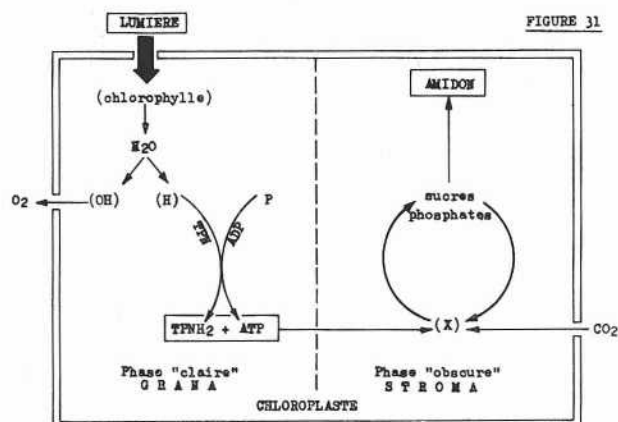


FIG. 31. — Schéma de la photosynthèse dans les chloroplastes isolés (Trebst, 1958).

Les résultats comparés de ces deux expériences sont fort intéressants. Tout d'abord le système catalytique s'est révélé tout à fait capable de fixer du CO₂, deux fois moins cependant que le système non catalytique (109 000 coups/minute contre 232 000 coups/minute). Ensuite, et c'est là le résultat le plus intéressant, des différences importantes se sont manifestées entre les deux systèmes quant à la nature des produits de la fixation du CO₂. Avec le système non catalytique on obtenait, non seulement du glycérate-3-phosphate, mais aussi et surtout des sucres phosphates (fig. 29).

Avec le système catalytique au contraire, le glycérate-3-phosphate est le principal produit de la fixation du ¹⁴CO₂ (fig. 32). En résumé, le système catalytique est capable de fixer du CO₂ pour former du glycérate-3-phosphate mais il est incapable de réduire ce glycérate-3-phosphate en sucres-phosphates. Comment expliquer ces résultats ?

D'après le schéma de la fixation du CO₂ selon Calvin (fig. 24), l'ATP intervient à deux endroits (réactions 44 et 31) alors que le TPNH₂ ne participe qu'à une seule réaction (32) :

- (44) ribulose-5-phosphate + ATP → ribulose-1,5-diphosphate + ADP
- (31) glycérate-3-phosphate + ATP → glycérate-1,3-diphosphate + ADP
- (32) glycérate-1,3-diphosphate + TPNH₂ → glycéral-déhyde-3-phosphate + PO₄H⁻ + TPN.

Autrement dit, pour fixer et réduire une molécule de CO₂ en sucre, il faut davantage d'ATP que de

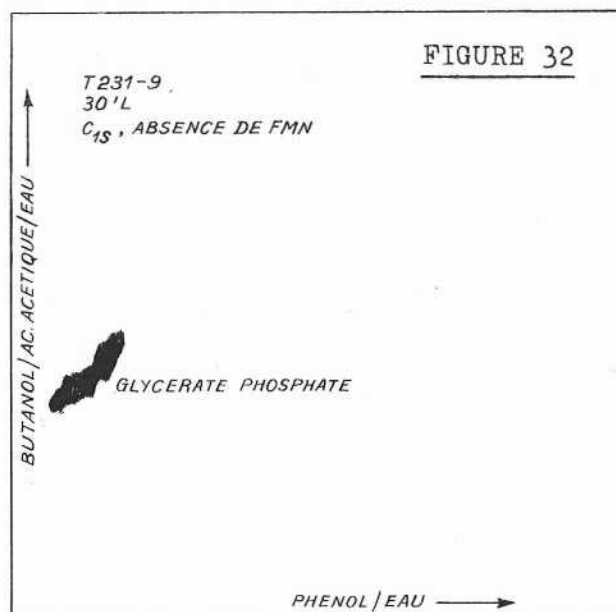


FIG. 32. — Radioautographe d'un chromatogramme montrant les produits solubles de la fixation du $^{14}\text{CO}_2$ à la lumière, par des chloroplastes brisés, en présence de l'extrait aqueux de chloroplastes (E. A. C.) et de quantités catalytiques d'ADP (0,5 micromoles/3,0 ml) et de TPN (0,3 micromoles/3,0 ml). « Précurseur » : glucose-1-phosphate (0,3 micromoles/3,0 ml) (Trebst 1959).

TPNH₂. Nous avons vu précédemment, en faisant le bilan des réactions de la figure 24, qu'il faut 18 molécules d'ATP et 12 molécules de TPNH₂ pour former une molécule d'hexose-phosphate, à partir de 6 molécules de CO₂. D'où le chiffre de 3 molécules d'ATP et de 2 molécules de TPNH₂ pour une molécule de CO₂.

Dans le système catalytique qui précède, où l'ATP et le TPNH₂ sont formés en quantités catalytiques par photophosphorylation non cyclique, donc dans le rapport de 1 ATP seulement pour 1 TPNH₂, l'accumulation du glycérate-3-phosphate et la quasi-absence de sucres phosphates fait penser immédiatement à un déficit d'ATP. En effet, tout semble se passer comme si la quantité catalytique d'ATP produite était presque entièrement consommée dans la première réaction où intervient l'ATP, à savoir dans la formation du ribulose-1,5-diphosphate (réaction 44) ; il ne resterait plus alors assez d'ATP pour réduire, avec l'aide du TPNH₂, le glycérate-3-phosphate en sucre-phosphate.

Pour vérifier le bien-fondé de cette interprétation, il faudrait pouvoir doter le système non-cyclique catalytique précédent d'une source supplémentaire d'ATP. La photophosphorylation cyclique offre cette possibilité. D'où l'idée d'ajouter au système non-cyclique

catalytique un cofacteur de la photophosphorylation cyclique (FMN, vitamine K ou PMS). C'est ce qu'ont réalisé Trebst, Losada et Arnon. La figure 33 montre qu'effectivement l'addition de 0,001 micromole de FMN au système catalytique a modifié profondément la nature des produits de l'assimilation du CO₂ : ce sont maintenant les sucres phosphates qui dominent, au détriment du glycérate-3-phosphate.

Dans l'expérience précédente, la quantité de FMN choisie, 0,001 micromole dans les 3 ml du mélange réactionnel, est une quantité *microcatalytique*, très inférieure à la quantité optimum pour la phosphorylation cyclique (0,1 micromole). Le choix d'une si petite quantité de cofacteur cyclique s'explique aisément. En effet, nous avons vu, au cours du chapitre IV (1, c) que l'addition d'un cofacteur cyclique à un système de phosphorylation non cyclique au TPN arrêterait le fonctionnement de ce système non cyclique et, partant, la formation de TPNH₂ et d'ATP, caractéristique de ce système ; seul se mettrait à fonctionner le système cyclique, caractérisé par la formation d'ATP sans TPNH₂. Mais alors qu'un tel effet est obtenu avec les concentrations optima du cofacteur cyclique (0,1-0,3 micromoles), cela n'est plus exact aux concentrations microcatalytiques (0,001-0,01 micromoles) : à ces faibles concentrations, il n'y a plus suppression du système non cyclique en faveur du

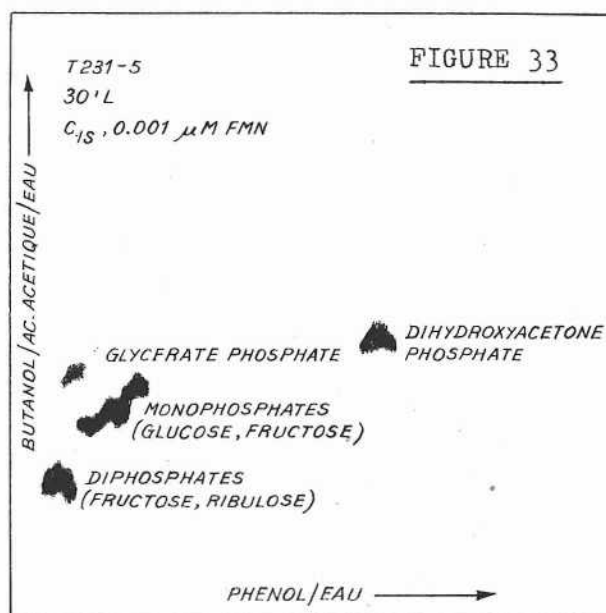


FIG. 33. — Radioautographe d'un chromatogramme montrant les produits solubles de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ à la lumière dans les mêmes conditions que celles de la figure 32, mais en présence de quantités micro-catalytiques de FMN (0,001 micromoles/3,0 ml) (Trebst, 1959).

système cyclique ; il y a au contraire superposition des deux systèmes, et cela se traduit par une formation plus grande d'ATP que de TPNH_2 ; condition précisément nécessaire à une assimilation réductrice de CO_2 en sucres phosphates. D'ailleurs si, au lieu d'ajouter au système catalytique d'assimilation du CO_2 , non pas des quantités *microcatalytiques* de cofacteur cyclique comme dans l'expérience de la figure 32, mais au contraire des quantités catalytiques optimum pour la phosphorylation cyclique, on constate que le glycérate-3-phosphate est à nouveau le principal produit de la fixation du CO_2 . En effet, dans ce système, la formation du TPNH_2 est pratiquement abolie et il ne se forme que de l'ATP par phosphorylation cyclique : en l'absence de TPNH_2 le glycérate-3-phosphate ne peut pas être réduit en sucres phosphates malgré la présence d'ATP en excès, et il s'accumule.

Ainsi donc, dans un système catalytique, c'est-à-dire dans un système où l'ATP et le TPNH_2 ne sont présents, à tout instant, qu'en quantités catalytiques, et où ils doivent être régénérés continuellement, comme dans la cellule intacte, dans un tel système, pour aboutir à une assimilation réductrice du CO_2 en sucres phosphates et non pas à une simple fixation du CO_2 en glycérate-3-phosphate, il faut établir un juste équilibre entre la phosphorylation non cyclique et la phosphorylation cyclique. Avec les chloroplastes isolés, cet équilibre est obtenu en jouant sur la concentration du cofacteur cyclique. Dans les cellules photosynthétiques entières, on doit admettre l'existence d'un mécanisme de régulation adéquat pour maintenir cet équilibre.

e) *L'assimilation du CO_2 par les chloroplastes isolés et le schéma de Calvin.*

Au cours des paragraphes précédents, nous nous sommes surtout attachés à mettre en évidence les corrélations entre photophosphorylations et assimilation de CO_2 , autrement dit, entre réactions « claires » et réactions « obscures ». Nous savons maintenant qu'en présence de quantités suffisantes d'ATP et de TPNH_2 (quantités-substrat), l'assimilation du CO_2 peut procéder à l'obscurité ; c'est une suite de réactions obscures. Lorsque l'ATP et le TPNH_2 ne peuvent intervenir qu'en quantités catalytiques, comme c'est le cas dans la cellule intacte, l'assimilation du CO_2 proprement dite reste bien le résultat d'une suite de réactions obscures, mais elle ne peut plus se dérouler à l'obscurité ; la lumière est continuellement nécessaire pour régénérer l'ATP et le TPNH_2 et davantage d'ATP que de TPNH_2 , par le jeu combiné de la phos-

phorylation non cyclique et de la phosphorylation cyclique ; mais c'est là le seul rôle de la lumière.

Pour interpréter ces résultats, nous avons eu souvent recours au schéma de l'assimilation du CO_2 suivant Calvin (fig. 24). Il devenait de plus en plus manifeste, au fur et à mesure des expériences, que dans les chloroplastes isolés, l'assimilation du CO_2 se faisait suivant le même schéma que celui mis en évidence par Calvin dans les cellules photosynthétiques intactes. Les récents travaux d'Arnon et de ses collaborateurs viennent apporter une confirmation supplémentaire à cette hypothèse (Losada, 1960 a ; Trebst, 1960).

Ils ont mis directement en évidence dans l'extrait aqueux de chloroplastes nombre d'enzymes caractéristiques du cycle de Calvin : carboxydismutase, phosphoglycérate kinase, triose phosphate déshydrogénase, aldolase et phosphatase.

Quant aux enzymes impliquées dans la régénération du ribulose-5-phosphate, leur présence dans les chloroplastes est déduite de l'augmentation de la quantité de CO_2 fixé, obtenue par addition d'un sucre-phosphate « précurseur » ; cette stimulation ne peut s'interpréter que par la transformation du « précurseur » en ribulose-5-phosphate ; d'où l'obligation d'admettre l'existence dans les chloroplastes ou plus précisément dans leur extrait aqueux, des enzymes impliquées dans ces transformations.

Ils ont confirmé de plusieurs façons que dans l'assimilation du CO_2 par les chloroplastes isolés, les sites d'action de l'ATP et du TPNH_2 sont les mêmes que ceux dans la cellule intacte ; pour l'ATP : phosphorylation du ribulose-5-phosphate en ribulose-1,5-diphosphate, et phosphorylation du glycérate-3-phosphate en glycérate-1,3-diphosphate ; pour le TPNH_2 : réduction du glycérate-1,3-diphosphate en glyceraldéhyde-3-phosphate.

Enfin, le premier produit de la fixation du CO_2 est bien le glycérate-3-phosphate : après une minute de fixation, c'est le seul produit mesurable, alors qu'après deux minutes, on obtient déjà 24 % de sucres phosphates.

Tous ces résultats sont schématisés dans la figure 34 qui illustre la synthèse des sucres par les chloroplastes isolés.

Ainsi, il fait peu de doutes que l'assimilation du CO_2 par les *chloroplastes isolés* s'effectue suivant le même schéma que celui mis en évidence par Calvin dans les cellules photosynthétiques *intactes* (cycle de Calvin, fig. 24).

L'assimilation du CO_2 suivant ce schéma n'est d'ailleurs pas restreinte aux plantes vertes ; il vient également d'être mis en évidence chez *Thiobacillus deni-*

trificans, une bactérie sulfureuse autotrophe non photosynthétique (Aubert, 1957).

f) *Assimilation du CO₂ par les chloroplastes isolés et par les feuilles entières : comparaison des rendements.*

Quelle est la quantité de CO₂ fixée par heure et par milligramme de chlorophylle, d'une part dans les chloroplastes isolés, d'autre part dans les feuilles entières ?

Pour qu'une telle comparaison soit valable, il faut comparer entre eux les chloroplastes d'une espèce végétale avec les feuilles entières de la même espèce végétale. C'est ce qu'ont fait Whatley et Allen (voir Losada, 1960 a).

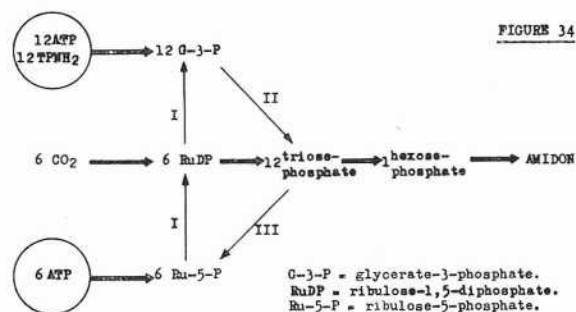


FIG. 34. — Synthèse des glucides par les chloroplastes isolés (Arnon, 1961 d).

Ils ont divisé un lot de feuilles d'épinard en deux ; avec l'une des moitiés ils ont préparés des chloroplastes isolés ; puis ils ont comparés ces chloroplastes aux feuilles entières de la deuxième moitié. Ils ont mis en évidence que la quantité de CO₂ fixé par les chloroplastes isolés (5 micromoles par heure et par milligramme de chlorophylle) représentait 25 % de celle assimilée par les feuilles entières (20 micromoles/hr/mg chl). Il s'agit là d'un pourcentage élevé compte tenu de toutes les manipulations qu'ont dû subir les feuilles pour en isoler les chloroplastes.

Il est évident qu'on trouvera un pourcentage plus faible en comparant la quantité de CO₂ fixée par les chloroplastes isolés (de l'ordre de 5 micromoles/hr/mg chl) avec la quantité *maximum* de CO₂ qui peut être fixée par des feuilles entières de plantes supérieures (180 micromoles/hr/mg chl) ou par les cellules intactes de *Chlorelles* (240 micromoles/hr/mg chl) (Gibbs, 1961). A côté de ces chiffres, ceux obtenus par Whatley et Allen pour les feuilles entières paraissent petits (20 à 30 micromoles/hr/mg chl).

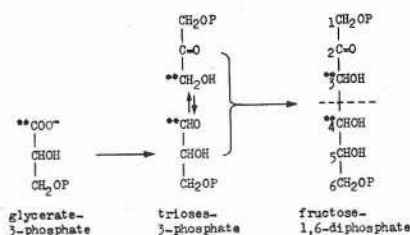
Quoi qu'il en soit, à l'heure actuelle la quantité de CO₂ fixée par les chloroplastes isolés ne représente que le quart, au mieux, de celle assimilée par les feuilles

entières, alors que la quantité d'ATP que peuvent former les chloroplastes isolés est aussi grande, sinon plus, que celle nécessaire dans les feuilles entières pour le fonctionnement du cycle de Calvin. En isolant les chloroplastes et en les brisant on affecte donc davantage l'assimilation du CO₂ que la photophosphorylation.

Cela provient sans doute du fait que l'appareillage de la photophosphorylation, très étroitement associé aux grana, est insoluble dans l'eau, alors que les enzymes de l'assimilation du CO₂, localisées dans le stroma, sont solubles dans l'eau. On conçoit donc que pendant la préparation des chloroplastes en milieu aqueux, comme c'est le cas, les enzymes de l'assimilation du CO₂ soient plus aisément perdues que celles de la photophosphorylation, liées à une structure insoluble. Pour la production de TPNH₂, par photophosphorylation non cyclique, une enzyme soluble du stroma est nécessaire, c'est la TPN-réductase photosynthétique. Il se pourrait que la perte partielle de cette enzyme pendant la préparation des chloroplastes contribue aussi à diminuer l'assimilation du CO₂ avec des chloroplastes isolés (Gibbs, 1961).

3. Retouches au cycle de Calvin.

L'une des caractéristiques principales du cycle de Calvin réside dans l'obtention de deux molécules de glycérate-3-phosphate par carboxylation d'une molécule de ribulose-1,5-diphosphate par une molécule de CO₂ (réaction 44). Quand le CO₂ utilisé est marqué au carbone 14, les carbones radioactifs se retrouvent d'abord dans le groupement carboxyl du glycérate-3-phosphate, pour constituer ensuite les carbones 3 et 4 du fructose-1,6-diphosphate :

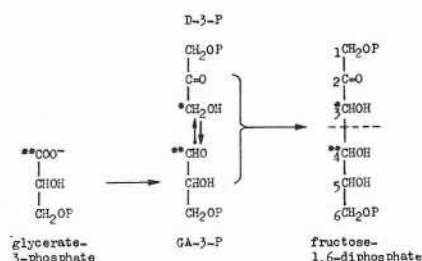


On voit que, dans l'hexose obtenu, le marquage du carbone 3 est égal à celui du carbone 4 : le marquage des carbones est symétrique par rapport à la ligne pointillée ; les deux moitiés de l'hexose sont marquées symétriquement. Certaines expériences de Calvin ont montré que telle était bien la répartition de la radioactivité entre les atomes de carbone des hexoses formés.

après un temps de fixation du $^{14}\text{CO}_2$ très court. Cette répartition symétrique de la radioactivité entre les deux moitiés de l'hexose est un des piliers du cycle de Calvin.

Gibbs et Kandler cependant ont montré que le glucose formé en éclairant des *Chlorelles*, en présence de C^{14}O_2 , pendant des temps très courts, n'était pas symétriquement marqué : le carbone 3 était moins marqué que le carbone 4, et les carbones 1 et 2 l'étaient davantage que les carbones 5 et 6 (Kandler, 1956 ; Gibbs, 1957). Trebst et Fiedler, en analysant le glucose formé à la lumière par des chloroplastes isolés, en présence de $^{14}\text{CO}_2$, pendant 5 minutes, ont confirmé ces résultats (Trebst, 1961).

Cette asymétrie dans la répartition de la radioactivité peut être expliquée suivant le cycle de Calvin. En ce qui concerne les carbones 3 et 4, elle proviendrait d'une équilibration incomplète entre le glycéraldéhyde 3-phosphate (GA-3-P) et le dihydroxyacétone-3-phosphate (D-3-P), ce qui se traduit par une radioactivité spécifique moins élevée du D-3-P que du GA-3-P (Bassham et Calvin, 1957, p. 40).



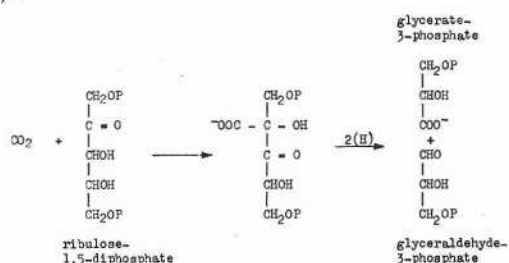
D'une façon générale, toute cause qui diminue la radioactivité spécifique du D-3-P pourrait se traduire, dans l'hexose qui se forme, par une radioactivité plus faible du carbone 3 que du carbone 4. Benson a indiqué que l'existence dans les chloroplastes d'un « pool » important de diglycérophosphate (DGP) pouvait être une telle cause ; en effet, le DGP peut être transformé aisément en D-3-P sous l'action de la glycérophosphate déshydrogénase.

Quant à la plus forte radioactivité des carbones 1 et 2 par rapport aux carbones 5 et 6, elle peut s'expliquer en admettant que certaines réactions de la « phase de régénération » (cycle des pentoses) qui normalement, pendant l'assimilation du CO_2 , mènent à la formation de pentoses à partir d'hexoses, peuvent se dérouler en sens inverse et aboutissent à la synthèse d'hexoses à partir des pentoses (Bassham et Calvin, 1957, p. 43 et 54).

On voit donc que la différence de marquage entre les deux moitiés de l'hexose peut être justifiée sans

qu'il soit nécessaire de mettre en cause le cycle de Calvin.

Les premières indications d'après lesquelles il faudrait néanmoins retoucher le cycle de Calvin viennent du laboratoire même de Calvin. En effet, Bassham et Kirk, d'après des données cinétiques, mettent en doute la formation de deux molécules de glycérate-3-phosphate dans la réaction de carboxylation du ribulose-1,5-diphosphate par le CO_2 . Il se formerait une molécule de glycérate-3-phosphate et une molécule d'un corps à trois atomes de carbone, qui pourrait être un triose phosphate. Dans ce cas, il y aurait « coupure réductrice » du produit de la carboxylation du ribulose-1,5-diphosphate par le CO_2 (Bassham et Calvin, 1957) :



Lorsqu'on effectue cette réaction de carboxylation *in vitro*, soit au moyen de carboxydismutase purifiée, soit au moyen de chloroplastes isolés, on n'obtient que du glycérate-3-phosphate et il n'y a pas d'indications qu'il se forme à côté d'une molécule de glycérate-3-phosphate une molécule de triose-phosphate ou de tout autre composé à trois atomes de carbone différent du glycérate-3-phosphate (G-3-P). C'est pourquoi Bassham et Kirk sont obligés d'émettre l'hypothèse que, dans la cellule intacte, le cycle de Calvin fonctionnerait suivant le mécanisme de la « coupure réductrice » ($\rightarrow 1 \text{ G-3-P} + 1 \text{ triose}$) alors que dans les systèmes *in vitro*, seule la coupure non réductrice ($\rightarrow 2 \text{ G-3-P}$) assurerait le déroulement du cycle. A l'heure actuelle, l'hypothèse est encore bien fragile ; elle est basée sur des données cinétiques qui ne permettent pas d'identifier les composés à trois atomes de carbone qui se formerait à côté de la molécule unique de G-3-P. Il se peut que ce soit un triose, mais Bassham et Kirk n'excluent pas la possibilité qu'il puisse, après tout, s'agir d'une deuxième molécule de G-3-P, distincte néanmoins de la première par le fait qu'elle serait liée solidement à une enzyme ; on aurait ainsi deux « pools », ou « réservoirs » de G-3-P, séparés l'un de l'autre ; ces deux pools de G-3-P pourraient donner, par réduction, deux pools distincts de trioses-phosphates ; un triose-phosphate du premier pourrait alors se condenser

avec un triose-phosphate du deuxième pour donner un hexose-phosphate qui, dans ces conditions, serait asymétriquement marqué, expliquant ainsi certains des résultats de Gibbs et de Kandler.

4. L'assimilation de CO_2 suivant Kandler.

Kandler avait été amené à critiquer le cycle de Calvin d'après ses résultats sur l'asymétrie du marquage des deux moitiés du glucose photosynthétisé par les Chlorelles en présence de $^{14}\text{CO}_2$. Kandler mettait en doute la phase de carboxylation et la phase de réduction du cycle de Calvin. Pour lui, l'acide cétonique, produit de la carboxylation du ribulose-1,5-diphosphate par le CO_2 , n'était pas coupé en deux molécules de glycérate-3-phosphate ; au contraire cet acide cétonique aurait été directement réduit en hexose-diphosphate. L'hypothèse de Kandler consistait donc à admettre que la synthèse des hexoses, en photosynthèse, s'effectuait suivant un mécanisme spécial à la photosynthèse (ribulose-1,5-diphosphate + $\text{CO}_2 \rightarrow$ hexose diphosphate) et non pas suivant les réactions inverses de la glycolyse une fois que le glycérate-3-phosphate était formé (glycérate-3-phosphate \rightarrow triose-phosphate). Kandler ne considérait pas le glycérate-3-phosphate comme le premier produit de l'assimilation du CO_2 ; pour lui, le glycérate-3-phosphate représentait un simple produit de dégradation de l'acide cétonique

quand celui-ci, en l'absence de réducteur (TPNH_2 ?), ne pouvait pas être réduit directement en hexose-diphosphate.

Récemment, Kandler et ses collaborateurs ont effectué de nouvelles expériences pour étayer cette théorie (Kandler, 1961). Ils ont étudié l'action d'un inhibiteur, l'acide moniodoacétique (AMIA) sur la respiration et la photosynthèse de Chlorelles. Après avoir donné du glucose uniformément marqué au carbone 14 à des Chlorelles à l'obscurité, inhibées par l'AMIA à la concentration de 10^{-3} M, ils ont observé d'une part une accumulation de fructose-1,6-diphosphate (FDP) et de trioses-phosphates et d'autre part une disparition de glycérate-3-phosphate. Ils expliquent ce résultat par l'inhibition de la triose-phosphate-déshydrogénase (fig. 35, flèches noires). Ensuite, quand ils allument la lumière, le FDP et les trioses-phosphates accumulés préalablement à l'obscurité, disparaissent en quelques minutes, alors qu'apparaissent au contraire le ribulose-diphosphate et le glycérate-3-phosphate (fig. 35, flèches claires). Kandler explique ce résultat par la transformation des hexoses-phosphates en ribulose-5-phosphate suivant la voie des pentoses, puis par la phosphorylation du ribulose-5-phosphate en ribulose-1,5-diphosphate, *non pas au moyen d'ATP*, car à la concentration de l'AMIA utilisée (10^{-3} M) la phosphoribulokinase doit être inhibée, mais *au moyen d'une réaction particulière à la photo-*

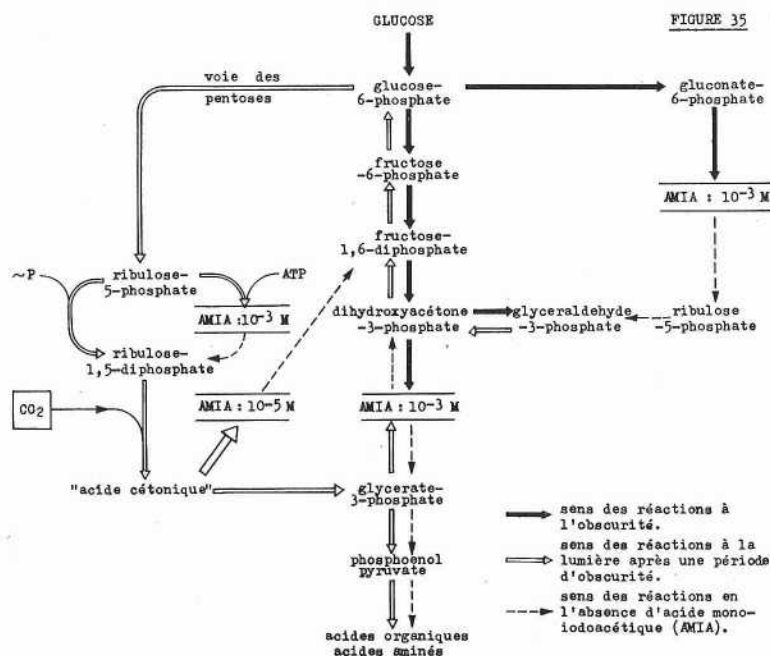


FIG. 35. — L'assimilation du CO_2 suivant KANDLER (Kandler, 1961).

synthèse, au cours de laquelle la liaison phosphate à haute énergie, $\sim P$, formée par photophosphorylation, serait transférée directement au ribulose-5-phosphate, sans passer par l'intermédiaire de l'ADP. Le ribulose-1,5-diphosphate ainsi formé serait carboxylé en l'acide cétonique qui se décomposerait en glycérate-3-phosphate. Le glycérate-3-phosphate ne peut être réduit en triose-phosphate, car la triose-phosphate-déshydrogénase est inhibée par la présence de l'AMIA à la concentration de 10^{-3} M ; il sera transformé en acides organiques et acides aminés.

Jusque-là, tout est conforme au cycle de Calvin, et l'accumulation de glycérate-3-phosphate peut s'expliquer par l'inhibition de la triose-phosphate-déshydrogénase par l'AMIA à la concentration de 10^{-3} M. Mais les résultats suivants ne peuvent plus s'expliquer ainsi. En effet, lorsque les Chlorelles assimilent du $^{14}\text{CO}_2$ à la lumière, en présence de AMIA à la concentration de 10^{-5} M, c'est-à-dire à une concentration cent fois plus faible que précédemment, la quantité de CO_2 fixée est fortement diminuée, alors que la triose-phosphate-déshydrogénase, elle, n'est pas encore inhibée. N'étant pas inhibée, cette enzyme pourrait donc transformer le glycérate-3-phosphate en triose-phosphate et donc amener une disparition de glycérate-3-phosphate et une apparition de sucres phosphates. Or, on constate l'inverse : le carbone radioactif du $^{14}\text{CO}_2$ fixé se retrouve principalement dans le glycérate-3-phosphate et non pas dans les sucres phosphates. Kandler conclut que le glycérate-3-phosphate n'est pas réduit en triose-phosphate alors qu'il devrait l'être suivant le schéma du cycle de Calvin puisque le fonctionnement de la triose-phosphate-déshydrogénase n'est pas inhibé et sachant par ailleurs que la formation photosynthétique de l'ATP et du TPNH₂ nécessaires à la réduction n'est pas inhibée non plus.

Donc, s'il n'y a pas formation de sucres phosphates en présence d'AMIA à la concentration de 10^{-5} M, c'est que : 1) le cycle de Calvin qui, dans ces conditions, est en mesure de fonctionner n'a rien à voir avec la synthèse des sucres et que 2) le véritable mécanisme de la synthèse des sucres est déjà inhibé à ces concentrations. Ce mécanisme, c'est la réduction à la lumière de l'acide cétonique formé par carboxylation du ribulose-1,5-diphosphate. Quand cette réduction ne peut avoir lieu, on obtient du glycérate-3-phosphate au lieu de fructose-1,6-diphosphate.

Les résultats précédents de Kandler, obtenus avec des cellules intactes de Chlorelles, sont en contradiction avec ceux de Trebst et coll. (Trebst, 1960) sur les chloroplastes isolés. Ainsi Kandler et coll. observent déjà une inhibition importante de l'assimilation photo-

synthétique de CO_2 pour une concentration de 10^{-5} M de l'AMIA, alors que Trebst, pour une concentration de 10^{-4} M, ne constate encore qu'une faible inhibition.

Ces différences incitent Kandler à penser que les chloroplastes isolés ne seraient pas capables d'effectuer la véritable photosynthèse, celle qui se déroule *in vivo* dans les cellules intactes. Les chloroplastes auraient perdu la capacité d'effectuer les deux réactions typiques de la véritable photosynthèse *in vivo* : 1) la phosphorylation du ribulose-5-phosphate au moyen de $\sim P$, sans passer par l'intermédiaire de l'ADP et 2) la réduction directe de l'acide cétonique en hexose-phosphate. Dans les chloroplastes, l'acide cétonique serait donc obligatoirement coupé en deux molécules de glycérate-3-phosphate qui alors seraient réduites suivant les réactions inverses de celle de la glycolyse ; cette réduction du glycérate-3-phosphate à l'obscurité serait peu rapide en comparaison de la véritable réduction photosynthétique *in vivo*, et expliquerait les faibles quantités de CO_2 fixé par les chloroplastes isolés.

Il est difficile d'évaluer à l'heure actuelle la théorie de Kandler à sa juste valeur. Elle n'est encore basée que sur des considérations d'inhibition. D'autres résultats doivent venir l'étayer. Dans la suite de cet article nous continuerons à admettre que l'assimilation du CO_2 suivant le cycle de Calvin représente bien la « véritable » photosynthèse et que les réactions photosynthétiques des chloroplastes isolés sont fondamentalement les mêmes que celles des cellules intactes.

VI. L'ASSIMILATION DU CO_2 CHEZ LES BACTÉRIES PHOTOSYNTHÉTIQUES

Chez les plantes vertes, l'ATP et le TPNH₂ formés à la lumière dans les chloroplastes, sont utilisés, au cours d'une série de réactions obscures, pour l'assimilation du CO_2 en sucres : la synthèse des glucides est la manifestation la plus importante de la photosynthèse chez les végétaux.

Les sucres ne semblent pas être les principaux produits de l'assimilation du CO_2 chez les bactéries photosynthétiques. Arnon et son équipe ont montré que l'assimilation du CO_2 par des cellules entières de Chromatium, en présence d'hydrogène gazeux, se traduit essentiellement, en ce qui concerne les produits solubles, par une synthèse d'aspartate et de quelques autres acides aminés ; très peu de sucres phosphates sont décelables (Losada, 1960 b).

Dans une telle « photosynthèse », quel est le rôle de la lumière ? Nous avons vu (chapitre IV) que les bac-

téries photosynthétiques, comme les plantes vertes, savent former de l'ATP par photophosphorylation cyclique et de l'ATP et du PNH_2 par photophosphorylation non cyclique. Est-ce que, chez ces bactéries, l'assimilation du CO_2 en aspartate procède par une suite de réactions « obscures » au moyen de la seule énergie de l'ATP et du TPNH_2 formés à la lumière ?

On peut d'ailleurs simplifier le problème. Les bactéries photosynthétiques, contrairement aux végétaux supérieurs, possèdent une hydrogénase et ont le pouvoir de réduire le pyridine nucléotide avec l'hydrogène gazeux à l'obscurité : l'énergie lumineuse n'est pas nécessaire pour former du PNH_2 . Le rôle de la lumière pourrait donc être limité à la seule formation d'ATP, à la condition que le réducteur, obligatoirement présent dans le milieu de culture de ces bactéries, soit l'hydrogène gazeux. Tel est effectivement le cas.

Arnon et ses collaborateurs ont montré l'équivalence entre la lumière et l'ATP au moyen d'un système subcellulaire de *Chromatium* composé de chromato-

phores, à condition d'ajouter de l'ATP au système non éclairé et de l'(ADP + P_i) au système éclairé. En utilisant le ribose-5-phosphate ou le pyruvate comme « précurseur », le principal produit de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ était l'aspartate ; avec le phosphoenol-pyruvate ou le glycérate-3-phosphate comme précurseur, ATP ou lumière + ADP + P_i n'étaient pas nécessaires à l'obtention de l'aspartate. Le schéma de la figure 36 explique ces résultats et illustre la suite des réactions.

Il convient de remarquer que l'assimilation du CO_2 suivant le schéma de la figure 36 n'est pas une assimilation réductrice : PNH_2 n'intervient pas. Arnon et ses collaborateurs ont cependant mis en évidence, dans des extraits de *Chromatium*, une triose-phosphate-déshydrogénase qui, à l'aide de DPNH_2 formé à l'obscurité ($\text{DPN} + \text{H}_2$), pourrait participer à la régénération du ribulose-1,5-diphosphate suivant la voie des pentoses.

En conclusion, chez les bactéries photosynthétiques, le seul rôle de la lumière réside dans la formation d'ATP lorsque la réduction du pyridine nucléotide est assurée par l'hydrogène gazeux. Comme chez les plantes vertes, l'assimilation du CO_2 procède par une suite de réactions obscures.

Fuller et Coll. viennent très récemment de confirmer et d'étendre les résultats précédents (Fuller, 1961).

VII. UTILISATION DE L'ATP ET DU TPNH_2 PHOTOSYNTHÉTIQUES POUR LA SYNTHÈSE DE PROTÉINES, DE LIPIDES...

Chez les plantes vertes, l'ATP et le TPNH_2 sont utilisés en majeure partie pour la formation des sucres. Longtemps, photosynthèse a été synonyme de synthèse des sucres. Que, dans les chloroplastes, telle soit l'utilisation de l'ATP et du TPNH_2 , ne découle pas d'une « loi fondamentale » de la photosynthèse, mais se trouve être la conséquence de l'organisation structurale du chloroplaste. Là se trouvent réunis côte à côte, associés efficacement, les grana photoproduit-
teurs d'ATP et de TPNH_2 et l'ensemble des enzymes nécessaires à l'assimilation du CO_2 ; dès leur formation ATP et TPNH_2 peuvent ainsi être immédiatement canalisés vers la synthèse des sucres. Il n'en est déjà plus de même chez les bactéries photosynthétiques où chromatophores et enzymes de l'assimilation du CO_2 ne sont pas associés dans une particule spécialisée ; chez elles, l'ATP et le TPNH_2 , produits par les chromatophores ne sont pas nécessairement dirigés vers la formation des sucres ; nous avons vu, au chapitre précédent, qu'on obtenait principalement des acides aminés. Rien n'empêche de penser que ces acides

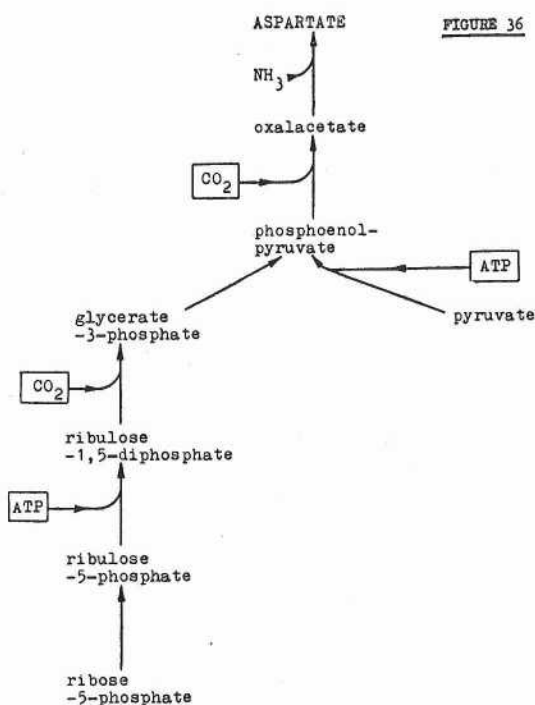


FIG. 36. — Assimilation du CO_2 par *Chromatium* (Losada, 1960 b).

phores et d'un extrait aqueux contenant les enzymes de l'assimilation du CO_2 . Les produits de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ étaient les mêmes à l'obscurité qu'à la

aminés peuvent être activés par une nouvelle molécule d'ATP pour servir ensuite à la synthèse des protéines bactériennes. Nous aurions ainsi une photosynthèse de protéines plutôt qu'une photosynthèse de sucres. Un tel mécanisme pourrait même exister dans le chloroplaste. En effet, Bové et Raacke ont pu mettre en évidence, dans les chloroplastes isolés, des enzymes qui activent les acides aminés au moyen d'ATP (Bové, 1959). Cette activation est considérée comme la première étape dans la suite des réactions qui mènent à la synthèse des protéines. Chaque acide aminé est très vraisemblablement activé par une enzyme spécifique. Dans les chloroplastes, ces enzymes sont associées au stroma et se retrouvent dans l'extrait aqueux de chloroplaste (EAC) lorsqu'on les sépare des grana. Bové et Raacke ont réussi à coupler l'activation des acides aminés à la formation d'ATP par phosphorylation cyclique à la lumière. Donc, là aussi, comme dans l'assimilation de CO_2 , le rôle de la lumière se réduit à la production d'ATP. D'autres expériences devront maintenant prouver que les acides aminés ainsi « activés » sont bien incorporés dans les protéines des chloroplastes.

De même, en ce qui concerne les lipides des chloroplastes, il semble très probable que l'ATP et le TPNH_2 photosynthétiques soient directement utilisés pour la formation de ces lipides, ou tout au

moins de leurs acides gras, lorsqu'on utilise l'acétate comme point de départ (Stumpf, 1961).

On voit donc que l'ATP et le TPNH_2 photosynthétiques peuvent servir à d'autres synthèses que celle des sucres, même dans le chloroplaste, si hautement spécialisé cependant dans la formation des glucides. En outre, il se pourrait que l'ATP photosynthétique participât non seulement aux synthèses intrachloroplastiques mais aussi aux synthèses cellulaires à l'extérieur des chloroplastes. En effet, lorsque l'assimilation du CO_2 cesse, pour une raison ou une autre, par manque de CO_2 , par exemple à la suite d'une fermeture des stomates, le chloroplaste peut néanmoins continuer à convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique de l'ATP par photophosphorylation cyclique ; cet ATP, en l'absence de CO_2 , pourrait être utilisé pour les synthèses cytoplasmiques hors du chloroplaste, venant s'ajouter ainsi à celui produit par phosphorylation oxydative dans les mitochondries (Whatley, 1959).

Le chloroplaste dans la cellule nous apparaît, en résumé, comme une véritable centrale énergétique, non seulement capable de pourvoir dans une large mesure à ses propres besoins, mais encore et surtout destinée à ravitailler la cellule en matériaux énergétiques : sucres d'une part, ATP et TPNH_2 d'autre part.

CONCLUSION

Les progrès réalisés dans le domaine de la photosynthèse au cours des quinze dernières années ont été spectaculaires.

L'avènement du carbone 14, isotope radioactif du carbone ordinaire, a permis de suivre le cheminement de l'atome de carbone tout le long des chaînes de réactions qui, en partant du gaz carbonique, aboutissent à la synthèse des sucres. L'attribution du Prix Nobel de chimie à Calvin en 1961 vient de récompenser ces travaux et de consacrer l'aspect traditionnel de la photosynthèse, celui de l'assimilation du gaz carbonique.

D'autres travaux, dus principalement à l'école d'Arnon, viennent maintenant de révéler que cet aspect traditionnel est par trop restreint, et qu'il faut lui substituer un concept plus général. Ces travaux ont établi que les réactions de l'assimilation du gaz carbonique suivant le schéma de Calvin ne sont pas des réactions photochimiques, mais des réactions « obscures » où la lumière n'intervient pas. L'unique rôle de la lumière dans la photosynthèse des plantes vertes réside dans la formation d'ATP et de TPNH_2 par photophosphorylation non cyclique et dans l'apport d'une quantité supplémentaire d'ATP par photophosphorylation cyclique. ATP et TPNH_2 sont les premiers produits stables de la photosynthèse chez les plantes vertes, et c'est par leur énergie chimique que s'effectue l'assimilation du gaz carbonique proprement dite, par une succession de réactions « obscures ». Mais comme la cellule ne dispose que de quantités catalytiques d'ATP et de TPNH_2 , ces deux cofacteurs doivent être régénérés continuellement à la lumière pour que l'assimilation du gaz carbonique puisse se poursuivre. Ainsi l'énergie chimique de l'ATP et du TPNH_2 est transférée aux sucres, et s'y trouve stockée.

L'ATP et le TPNH_2 photosynthétiques peuvent être utilisés pour « pousser » des réactions endergoniques très diverses, mais chez les plantes vertes ils servent principalement à assimiler le gaz carbonique en sucres, parce que dans le chloroplaste, siège de toutes les réactions photosynthétiques, les enzymes de l'assimilation du gaz carbonique en glucides sont étroitement associées à l'appareillage photoproduit d'ATP et de TPNH_2 .

Les bactéries photosynthétiques utilisent également l'énergie lumineuse pour former par photophosphorylation non cyclique du TPNH_2 en même temps que de l'ATP. Mais elles ne dépendent pas exclusivement de l'énergie lumineuse pour former leur TPNH_2 : grâce à leur hydrogénase, elles ont la possibilité de réduire le PN à l'obscurité à condition de disposer d'hydrogène gazeux. Dans ces conditions le rôle de l'énergie lumineuse est limité à la seule formation d'ATP par photophosphorylation cyclique.

À l'origine de la vie, les premiers organismes photosynthétiques furent sans doute des bactéries chez lesquelles la photosynthèse était réduite à la formation d'ATP par phosphorylation cyclique ; elles n'avaient pas besoin de la phosphorylation photosynthétique non cyclique pour produire leur PNH_2 , car, grâce à leur hydrogénase, elles étaient capables de réduire PN à l'obscurité au moyen de l'hydrogène gazeux, fort abondant dans le milieu extérieur à ces premières époques de la vie. Puis au fur et à mesure que l'hydrogène gazeux disparaissait de l'atmosphère ambiante, force leur était faite de former leur PNH_2 par photophosphorylation non cyclique au moyen de donneurs d'électrons moins forts que l'hydrogène, tels que le thiosulfate ou le succinate : l'énergie lumineuse était maintenant nécessaire non seulement pour former de l'ATP, mais aussi pour amener les électrons du thiosulfate, du succinate, au même niveau de réduction que celui, élevé, des électrons de l'hydrogène gazeux. Ces électrons « activés » n'étaient pas exclusivement utilisés pour réduire le PN ; ils pouvaient aussi se combiner aux protons (H^+) pour former de l'hydrogène gazeux, ou à l'azote gazeux pour le « fixer » (photo production d'Hydrogène, photofixation d'Azote).

Quand les donneurs d'électrons bactériens, tels que le thiosulfate ou le succinate se raréfiaient, les plantes vertes allaient pouvoir prendre un développement considérable : elles avaient sur les bactéries photosynthétiques l'avantage énorme de pouvoir utiliser, et d'avoir à leur disposition un donneur d'électron universellement répandu, l'eau.

L'utilisation de l'eau comme donneur d'électron n'est possible que parce que les plantes vertes possèdent une réaction lumineuse auxiliaire, la photo-oxydation de l'eau, grâce à laquelle les électrons de l'eau sont portés à un niveau énergétique plus élevé, comparable à celui des électrons de donneurs d'électrons bactériens (thiosulfate, ...). On aboutit ainsi au transport d'électrons non cyclique chez les plantes vertes où les électrons de l'eau sont amenés à réduire le TPN, moyennant deux réactions lumineuses, 1) la photo-oxydation de l'eau et 2) la réaction lumineuse fondamentale, celle commune à tous les organismes photosynthétiques. L'utilisation de l'eau comme donneur d'électrons a un corollaire : c'est le dégagement d'oxygène gazeux caractéristique de la photosynthèse chez les plantes vertes. L'oxygène photosynthétique constitue le déchet de la photo-oxydation de l'eau.

Voilà résumée, sous forme d'affirmations, cette nouvelle conception de la photosynthèse suivant D. I. Arnon. Ce n'est encore qu'une théorie, mais une théorie qui a ouvert de nouveaux horizons dans le domaine bicentenaire de la photosynthèse, et que de nouvelles expériences viennent étayer sans cesse (Arnon, 1961 e).

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (M. B.), ARNON (D. I.), CAPINDALE (J. B.), WHATLEY (F. R.) & DURHAM (L. J.), 1955. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 77 (1955), 4149-4155.
 ARNON (D. I.), ALLEN (M. B.) & WHATLEY (F. R.), 1954. — *Nature*, 174 (1954), 394.
 ARNON (D. I.), ALLEN (M. B.) & WHATLEY (F. R.), 1956. — *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956), 449-461.

- ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) & ALLEN (M. B.), 1959 a. — *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959), 47-57.
 ARNON (D. I.), 1961 d. — *Bull. Torrey Botan. Club*, 88 (1961), 215-259.
 ARNON (D. I.), MITSUI (A.), & PANEQUE (A.), 1961 e. — *Science*, 134 (1961), 1425.
 AUBERT (J. P.), MILHAUD (G.) & MILLET (J.), 1957. — *Ann. Inst. Pasteur*, 92 (1957), 515.

- BASSHAM (J. A.), 1957. — Dans « Research in Photosynthesis », Interscience Publishers, 1957, p. 300.
- BASSHAM (J. A.) & CALVIN (M.), 1957. — The Path of Carbon in Photosynthesis. Prentice Hall, Inc., 1957.
- BASSHAM (J. A.), & KIRK (M.), 1960. — *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960), 447-464.
- BOVÉ (J. M.) & RAACKE (I. D.), 1959. — *Archiv. Biochem. Biophys.*, 85 (1959), 521-531.
- BOVÉ (J. M.), 1961 a. — *Fruits*, 16 (1961), 89-101.
- BOVÉ (J. M.), 1961 b. — *Fruits*, 16 (1961), 352-364.
- BOVÉ (J. M.), 1961 c. — *Fruits*, 16 (1961) 479-511.
- FULLER (R. C.), SMILLIE (R. M.), SISLER (E. C.) & KORNBERG (H. L.), 1961. — *J. Biol. Chem.*, 236 (1961), 2140-2149.
- GIBBS (M.) & KANDLER (O.), 1957. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 43 (1957), 446-451.
- GIBBS (M.), BLACK (C. C.) & KOK (B.), 1961. — *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961), 474-477.
- HORECKER (B. E.), 1958. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XL (1958), 555.
- KANDLER (O.), & GIBBS (M.), 1956. — *Plant Physiol.*, 31 (1956), 411-412.
- KANDLER (O.), LIESENKÖTTER (I.) & OAKS (B. A.), 1961. — *Z. Naturforschg.*, 16 b (1961), 50-61.
- LELOIR (L. F.), RONGINE DE FEKETE (M. A.) and CARDINI (C. E.), 1960. — *J. Biol. Chem.* 235 (1960), 636-641.
- LOSADA (M.), TREBST (A. V.) & ARNON (D. I.), 1960 a. — *J. Biol. Chem.* 235 (1960), 832-839.
- LOSADA (M.), TREBST (A. V.), OGATA (S.) & ARNON (D. I.), 1960 b. — *Nature*, 186 (1960), 753-760.
- STUMPF (P. K.), et coll. 1961. — Manuscrit en préparation.
- TREBST (A. V.), TSUJIMOTO (H. Y.) & ARNON (D. I.), 1958. — *Nature*, 182 (1958), 351-355.
- TREBST (A. V.), LOSADA (M.) & ARNON (D. I.), 1959. — *J. Biol. Chem.*, 234 (1959), 3055-3058.
- TREBST (A. V.), LOSADA (M.) & ARNON (D. I.), 1960. — *J. Biol. Chem.*, 235 (1960), 840-844.
- TREBST (A. V.) & FIEDLER (F.), 1961. — *Z. Naturforschg.* 11 b (1961), 284-285.
- WHATLEY (F. R.), ALLEN (M. B.), ROSENBERG (L. L.), CAPINDALE (J. B.) & ARNON (D. I.), 1956. — *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956), 462-468.
- WHATLEY (F. R.), ALLEN (M. B.) & ARNON (D. I.), 1959. — *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959), 32-46.



ERRATUM N° 1.

Dans la deuxième partie de cette étude, parue dans *Fruits*, vol. 16, n° 10, p. 480, une erreur s'est glissée à la 4^e ligne du texte.



ERRATUM N° 2.

Dans ce même article, page 509, remplacer le cliché inversé et mal imprimé de la 1^{re} colonne par le cliché ci-dessous.

